UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1964 N° 2

Contribution à l'Étude

de la recherche des cellules néoplasiques dans le sang par la méthode de leucoconcentration

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en Janvier 1964

PAR

FRANÇOISE ROULEAU-MARCASSUS

Membres du Jury

MM. J. GADRAT — Président
Ch BIMES
A. PONTONNIER — Assesseurs
J. MONNIER
P. BEC — Suppléant

IMPRIMERIE SOUBIRON
9, Rue de la Poste
TOULOUSE

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE DE MEDECINE & DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN : Monsieur LAZORTHES
1er Assesseur : M. BLANC
2ème Assesseur : M. SOREL

DOYENS HONORAIRES : Messieurs GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.

PROFESSEURS HONORAIRES : Messieurs RIBAUT, VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BOUNHOURE, BUGNARD.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. MERIEL
Clinique médicale	GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique	FABRE Pierre
Clinique chirurgicale et du cancer	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX
Clinique des maladies de la tuberculose et path. interne	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL
Clinique médicale de la 1ère Enfance	BARDIER
Clinique de neuro-chirurgie	LAZORTHES
Clinique neurologie et psychiatrique	GERAUD
Clinique obstétricale	GUILHEM Paul
Clinique odonto-stomatologique	CADENAT
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Clinique ORL et chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Clinique rhumatologique	RUFFIE René
Clinique traumatologie des membres	RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale	PONTONNIER
Anatomie	N...
Anatomie appliquée	POULHES
Anatomie Pathologique	FABRE Jacques
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale	ANDRIEU
Chimie biologique	VALDIGUIE
Electro-radiologie	MARQUES
Embryologie générale	BROUSSY Jean
Histologie	BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DARNAUD
Médecine légale et médecine du travail	PLANQUES
Médecine sociale	N...
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Physico-chimie	AUVERGNAT
Physiologie	LAPORTE Yves
Physiologie appliquée et pharmacologie	BAISSET
Physique biologique et médicale	N...
Propédeutique médicale	LAPORTE Jacques
Thérapeutique	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	COULOUMA
Bactériologie	Mme ENJALBERT
Biochimie médicale	DOUSTE-BLAZY
Médecine Générale	MONNIER
Oto-Rhino-Laryngologie	CLAUX
Pathologie médicale	BOULARD
Pathologie chirurgicale	LAGROT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Histologie et Embryologie	PLANEL
Ophtalmologie	DEODATI
Parasitologie	RUFFIE Jacques
Physiologie	MONTASTRUC
Physique médicale	BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	BASTIDE
Anatomie Pathologique	BOUISSOU
Anesthésiologie	LARENG
Carcinologie	ESTRADE
Chirurgie générale	GEDEON
Electroradiologie	PONS
Hématologie	DUCOS
Histologie et embryologie	GUILHEM André
Pathologie expérimentale	GLEIZES
Physiologie	BESSOU
Physique médicale	COMMANAY
Pneumo-phtisiologie	MIGUERES

AGREGES

Médecine générale	RIBAUT
d°	CALAZEL
d°	RASCOL
d°	LE TALLEC
d°	RIBET
Chirurgie générale	ENJALBERT
d°	FICAT
d°	PASQUIE
d°	SOUQUET
d°	SARRAZIN
d°	GAUBERT
Dermatologie et syphiligraphie	DUPRE
Hydrologie	DENARD
Médecine légale	GREZES-RUEFF
Neurochirurgie	ESPAGNO Jacques
Neurologie et psychiatrie	GAYRAL
Obstétrique	ESPAGNO Guy
Ophtalmologie	BEC
Pneume-phtisiologie	DELAUDE

AGREGES LIBRES

Anatomie	THOMAS
Pathologie chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	BOURBON
Chimie pharmaceutique	BLANC
Matière médicale	VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	CAUJOLLE
Pharmacie galénique	STANISLAS
Zoologie	ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Botanique	ROQUES
Pharmacie	COUTURIER
Sciences Naturelles	Mme CAUJOLLE

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie	BREUILLAUD
Sciences Physiques	PITET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Toxicologie	BROUSSY Georges

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	ROCHE
Secrétaire	BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats. (Délibération en date du 12 mai 1891).

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0047

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1964 N° 2

Contribution à l'Étude

de la recherche des cellules néoplasiques dans le sang par la méthode de leucoconcentration

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en Janvier 1964

PAR

FRANÇOISE ROULEAU-MARCASSUS

Membres du Jury

MM. J. GADRAT — Président
Ch BIMES
A. PONTONNIER — Assesseurs
J. MONNIER
P. BEC — Suppléant

IMPRIMERIE SOUBIRON
9, Rue de la Poste
TOULOUSE

Contribution à l'Étude

de la recherche des cellules néoplasiques dans le sang par la méthode de leucoconcentration

Cette Thèse est dédiée :

A la mémoire de mon père
le Docteur Jean MARCASSUS

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

A mon frère
le Docteur Jacques MARCASSUS

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

A ma mère

A mon mari et à mes enfants

A Monsieur le Docteur Roger BOURSE

qui nous a aidée et guidée dans l'élaboration de ce travail. Sincères remerciements.

Au personnel du Laboratoire

du Service de Monsieur J. GADRAT

INTRODUCTION

Pour l'établissement de la formule leucocytaire l'étude du simple frottis d'une goutte de sang ne permet qu'une vue infime des cellules circulantes nuclées, les leucocytes étant en proportion très faible par rapport aux globules rouges.

Cependant en plus des éléments que nous rencontrons communément sur les lames, peuvent circuler en proportions faibles des cellules malignes ou des cellules sanguines plus rares dont de nombreux travaux ces dernières années ont souligné l'intérêt.

L'objet de notre travail a été d'apporter une contribution à l'étude cytologique de ces éléments rares du sang circulant en examinant de plus grandes quantités de sang après élimination des hématies.

Dans une première partie nous rappelerons les principaux travaux se rapportant aux différentes méthodes d'enrichissement leucocytaire. Nous exposerons ces différentes méthodes, leurs avantages et leurs inconvénients.

Nous décrirons ensuite la méthode que nous avons choisie : mise au point d'une technique de concentration leucocytaire simple mais permettant d'obtenir un matériel cytologique aussi intact que possible pour pouvoir être identifiée.

Dans une deuxième partie, nous exposerons les résultats des examens pratiqués chez des sujets atteints de cancer.

D'autre part, nous rendrons compte des résultats enregistrés chez quelques sujets atteints d'affection

hématologique.

Enfin, nous confronterons dans une troisième partie nos résultats avec ceux de quelques auteurs et nous essaierons de mettre en relief l'intérêt de cette recherche dans le diagnostic et l'évolution des processus malins.

Il nous semble toutefois nécessaire de souligner dès à présent certaines difficultés auxquelles nous nous sommes heurtée :

Les altérations cytologiques inévitables dues aux manipulations, les difficultés rencontrées pour étiqueter certaines cellules atypiques rendent souvent le diagnostic de cellules malignes délicat.

Le faible nombre de cas étudiés, l'impossibilité de contrôler l'évolution de l'affection chez quelques sujets, n'a pas permis d'établir l'intérêt pratique immédiat de cet examen, que ce soit dans un but diagnostique ou dans un but pronostique.

PREMIERE PARTIE

DIFFERENTES TECHNIQUES D'ENRICHISSEMENT LEUCOCYTAIRE

I) - *HISTORIQUE* -

La présence en faible nombre de cellules anormales, c'est-à-dire n'appartenant à aucune lignée sanguine, dans le sang de malades atteints de cancer a été démontrée depuis longtemps.

Les premiers travaux semblent avoir été réalisés au cours de vérifications nécropsiques et quelques auteurs, tel ASHWORTH en 1899, constatent la présence de cellules anormales dans le sang de cancéreux : ASHOFF quelques années plus tard rencontre de très grandes cellules dans le sang périphérique d'un malade mort de myelome. Vers la même époque WARD observe de très grandes cellules dans le sang périphérique quelques heures avant la mort d'un malade atteint de cancer et pense qu'il s'agit de cellules tumorales.

Dans les mêmes circonstances MARCUS en 1919 trouve sur un simple frottis de sang prélevé au bout du doigt des cellules anormales chez un sujet porteur d'un cancer des bronches.

Ensuite se situent quelques tentatives d'études plus systématiques. Sur le sang prélevé post-mortem QUENSEL (1921) trouve des cellules anormales dans 6 cas sur 14 d'épithéliomas gastriques. En 1934 POOL & DUNLOP examinent le sang directement chez des malades atteints de cancer et trouvent des cellules "atypiques" dans 17 cas sur 40.

A partir de 1956 sous l'impulsion d'ENGELL (Danemark) ces recherches vont prendre de l'importance. Le nombre de cas examinés est beaucoup plus grand. Les différents chercheurs vont employer les techniques de concentration leucocytaire. Les travaux vont se multiplier et vont surtout être axés sur le recherche, l'identification, la valeur pronostique de la présence de cellules néoplasiques dans le sang circulant. Ces recherches vont porter soit sur le sang efférent d'une tumeur, soit sur le sang veineux périphérique. Les techniques de concentration et de séparation globulaire vont se multiplier en faisant appel à des procédés chimiques ou physiques et les méthodes d'examen elles-mêmes (frottis, coupes, différents types de coloration) vont varier suivant les auteurs.

Parmi les travaux les plus importants, il faut citer ceux de ENGELL, SANDBERG, et MOORE (U.S.A.) STUART Roberts (U.S.A.), MALMGREEN, POTTER, LE ROY LONG, GASTPAR (Allemagne). En France HERBEUVAL et l'Ecole de Nancy, se sont particulièrement intéressés à cette question et lui ont consacré d'importantes publications.

Parallèlement, de nombreuses techniques de concentration leucocytaire et surtout de séparation globulaire ont été proposées dans des buts différents.

Le plus souvent, ces techniques visent à obtenir une population sanguine déterminée en vue de recherches:

- immunologiques : analyse antigénique, préparation d'anti-sérums, étude de groupes leucocytaires,
- biochimiques : étude de certains enzymes,
- physiologiques : mobilité cellulaire, chimiotactisme, phagocytose,
- génétiques et cytologiques : étude de cultures de cellules normales et pathologiques.

II) - *METHODES GENERALES DE CONCENTRATION LEUCOCYTAIRE* -

a) Principes -

Toutes les techniques d'enrechissement obéissent à un principe simple, qui consiste en l'élimination des globules rouges qui gènent par leur qualité et leur quantité surtout, les études morphologiques, chimiques ou immunologiques des globules blancs. Les leucocytes sont très dispersés dans le sang. Leur quantité totale est minime par rapport à la masse totale des hématies : de l'ordre de 1/800ème environ. Il existe donc de grosses difficultés techniques pour arriver à se débarrasser presque totalement de cette énorme masse. Des méthodes se basant sur les propriétés différentes des hématies et des leucocytes ont pu êtres mises au point.

- Certaines visent à conserver une intégrité biologique aussi parfaite que possible par exemple pour les cultures de tissus.

- D'autres tendent à une purification très poussée pour les études immunologiques et chimiques.

- En ce qui nous concerne, le but principal à atteindre a été obtenir une bonne conservation de la morphologie cellulaire pour l'examen d'un simple frottis au microscope optique ordinaire.

b) Techniques -

Les techniques utilisées reposent sur quatre principes différents : sédimentation, centrifugation, flottaison, hémolyse, toutes s'adressent à un sang incoagulable.

1°/ *Techniques de sédimentation* -

Le principe de cette méthode est très simple : c'est la technique qui en pratique courante est utilisée au laboratoire pour la détermination de la vitesse de sédimentation. Le sang reposant dans un tube à une tem-

pérature donnée est séparé en trois couches suivant les différences de densité de ses divers éléments
- une couche supérieure : le plasma
- une deuxième très mince groupe leucocytes et plaquettes
- une inférieure renferme tous les globules rouges.

Mais cette sédimentation spontanée est assez longue et insuffisante pour éliminer de façon complète les globules rouges. Elle pourra être accélérée par inclinaison du tube ou par adjonction de substances naturelles ou chimiques qui provoquent la formation de rouleaux d'hématies. Ces substances sont toutes des molécules très longues et asymétriques.

- Parmi les produits naturels, le fibrinogène est souvent en cause dans l'accélération de la vitesse de sédimentation globulaire au cours de certains états pathologiques ; les γ globulines jouent le même rôle. Au laboratoire le fibrinogène bovin peut être ajouté comme accélérateur de la vitesse de sédimentation.

- Parmi les produits de synthèse il faut citer :
- le dextran, polymère du glucose,
- le polivinyl-pyrolidone ou "subtosan" ;
- on peut citer aussi : la gélatine, la gomme arabique, l'acide hyaluronique et tout récemment un très bon accélérateur l'hexadiméthrine bromide ou "polybrène, dont les propriétés se rapprochent du sulfate de protamine.

Cependant ces techniques sont très lentes : on obtient souvent une mauvaise séparation globulaire, par contre on réalise aussi une bonne conservation des éléments cellulaires.

2°/ *Techniques de centrifugation*

Elles sont plus rapides que les précédentes. En pratique courante la mesure de l'hématocrite est un exemple courant de séparation du sang par centrifugation. Pour obtenir une meilleure séparation des éléments, on peut faire appel à des centrifugations différentielles :

- une centrifugation à faible vitesse permet une première élimination d'une grande quantité d'hématies.
- une deuxième centrifugation permet d'obtenir un culot leucocytaire plus ou moins pur qui sera ensuite lavé.

Ces techniques pauvent aussi faire appel à des appareils spéciaux, quelques fois assez compliqués à réaliser mais qui permettent d'obtenir des séparations rapides, nettes, des différents éléments. Parmi ces appareils on peut citer le tube de Bessis à étranglement médian,le tube d'Ottesen qui porte un flotteur. Certains auteurs congèlent le sang dans des tubes en matière plastique et sectionnent ces tubes aux niveaux de séparation des différentes couches globulaires.

On peut adresser à ces techniques la critique suivante : dans le cas de la centrifugation simple, la minceur de la couche leucocytaire est un obstacle à son prélèvement ; dans le cas des appareils spéciaux, le prélèvement de cette couche est également difficile à faire.

3°/ *Techniques de flottaison*

Ces techniques séparent les éléments figurés du sang par ajustement du poids spécifique du milieu de centrifugation. Elles sont surtout employées pour la discrimination entre cellules tumorales d'une part et globules blancs d'autre part.

VALLEE emploie comme milieu une solution d'albumine bovine,

SPEAR une solution de gomme arabique, SEAL, de l'huile siliconée.

Les cellules se groupent les unes au-dessus de la surface de séparation du liquide, cellules tumorales et lymphocytes, les autres au-dessous, polynucléaires et hématies.

Cependant on rencontre de grosses difficultés pour obtenir une solution bien ajustée, et la discrimination cellulaire est souvent imparfaite.

4°/ *Techniques d'hémolyse*

Cette méthode est communément employée au Laboratoire puisque le liquide de Lazarus pour la numération des globules blancs est un liquide acide provoquant l'hémolyse érythocytaire.

L'eau distillée et l'eau acidifiée en lavages successifs réalisent une destruction des hématies.

Parmi les produits chimiques qui réalisent une destruction des globules rouges, on peut citer la saponine, la gramicidine, la lysocithine, la phythohemaglutinine extraite du haricot rouge "Phaseolus vulgaris". On peut obtenir par ces produits, de très bons enrichissements leucocytaires, mais ces substances ont une action cytotoxique certaine ; la saponine lèse la membrane leucocytaire. Cependant l'ensemble des résultats est bon et certains auteurs ont pu obtenir des cellules cultivables.

Très souvent ces différentes techniques se complètent les unes les autres et on peut combiner sédimentation et hémolyse, sédimentation, puis centrifugation et hémolyse.

c) *Applications* -

Malgrè les insuffisances de ces méthodes, les auteurs qui ont fait appel à ces différentes techniques pour la recherche des cellules tumorales ont pu obtenir des résultats intéressants quant à la bonne conservation de la morphologie des cellules anormales.

ENGELL (1957), le premier à employer l'hémolyse globulaire pour la recherche des cellules tumorales utilise la saponine. Le culot obtenu après centrifugation est inclus dans de la paraffine et la série complète des coupes colorées par la méthode de Papanicolaou est examinée au microscope. Cet auteur compare chez un même individu, l enrichissement réalisé à partir du sang efférent d'une tumeur, prélevé au cours de l'intervention chirurgicale à celui du sang périphérique.

SANDBERG et MOORE (1957) se débarrassent des globules rouges par sédimentation accélérée à l'aide de fibrinogène bovin. Ils aspirent le liquide surnageant centrifugent et obtiennent des cellules ou des groupes de cellules qu'ils ont pu comparer avec des coupes histologiques de la tumeur correspondante.

STUART Roberts combine la sédimentation accélérée des hématies par le fibrinogène bovin à la flottaison sur albumine pour séparer les cellules tumorales plus légères que les autres éléments du sang : les cellules tumorales flottant à la surface de l'albumine sont aspirées étalées sur lames, et examinées au microscope.

MALMGREEN, PRUITT, DEL VECCHIO, utilisent l'hémolyse à la streptolysine, filtrent le culot à travers des "milipore filters" sous pression négative, ce qui laisse passer la majorité des lymphocytes. Le résidu contenant les cellules tumorales est alors examiné. Ces auteurs emploient des quantités de sang assez importantes.

ALEXANDER et SPRIGGS, emploient pour la sédimentation des hématies : le Dextran.

SEAL, le premier, utilise la méthode de flottaison à l'huile siliconée pour séparer cellules tumorales et polynucléaires. Cette méthode a été reprise par GREAPER qui auparavant réalise la sédimentation des hématies par la polivynil pyrolidone.

En France HERBEUVAL et l'Ecole de Nancy, reprennent la technique d'ENGELL par la saponine et ajoutent un liquide à base de formol, car ils cherchent à conserver les leucocytes.

DARGENT, FAUCON, POMMATAU (Lyon) emploient le subtosan comme accélérateur de la sédimentation. Comme le culot terminal garde beaucoup d'hématies, ils ajoutent de la streptolysine pour hémolyser ce reliquat.

DE BRUX, ANCLA (Paris) utilisent de la streptolysine d'après la méthode de LE ROY LONG et examinent le

culot restant soit par des méthodes histologiques, soit par simple frottis sur lame.

ISHIKAWA et COLL (Japon) après centrifugation, repèrent les cellules anormales grâce à des colorants fluorescents tels que l'acridine orange.

Les lieux de prélèvement de sang varient suivant les auteurs, certains examinent le sang veineux périphérique en comparaison avec le sang efférent d'une tumeur en cours d'intervention où on a le maximum de chance de rencontrer des cellules tumorales.

Les culots ainsi obtenus sont examinés au microscope.

Pour l'examen cytologique, les méthodes employées de fixation et de coloration sont :

soit des méthodes histologiques : inclusion du culot dans la paraffine et coupes.

- soit des méthodes hématologiques : étalement simple du culot sur lames.

Les colorations employées sont :

- soit des méthodes employées en cancérologie : technique de Papanicolaou,
- soit des méthodes hématologiques : coloration panoptique de Pappenheim.

Récemment l'emploi de colorants fluorescents a donné des résultats beaucoup plus rapides et intéressants, mais il faut comparer les mêmes lames avec celles faites avec les colorants habituels.

III) - *TECHNIQUE PERSONNELLE* -

Nous avons essayé de mettre au point une technique de concentration leucocytaire aussi simple que possible. Cette méthode nous a permis d'obtenir un matériel cytologique conservant une morphologie à peu près intacte pour pouvoir être identifiée. Le résultat n'a pu être obtenu qu'aux prix de manipulations traumatisantes pour le matériel cellulaire et il a été difficile de mettre

au point une technique alliant deux qualités principales.

- la première d'ordre qualitatif : conserver une morphologie cellulaire aussi intacte que possible ;

- la seconde d'ordre quantitatif : obtenir un très bon enrichissement en éléments cellulaires rares après élimination des hématies.

a) Principe -

Nous avons choisi une méthode associant d'une part la destruction des erythrocytes par un hémolysant spécifique, d'autre part une centrifugation à vitesse réduite pour réaliser un culot leucocytaire. Le culot obtenu est ensuite étalé sur lames, séché à l'air et coloré par la méthode panoptique de Pappenheim.

b) Description -

1°/ Préparation de l'enrichissement leucocytaire.
2°/ Examen des frottis.

1°/ *Préparation de l'enrichissement*

Nous avons choisi comme lieu de prise de sang une veine du pli du coude d'accès plus facile et cette technique de prélèvement rentre facilement dans la routine quotidienne.

Nous avons recueilli 10cm3 de sang dans un flacon hépariné. Le matériel employé est très réduit : un tube à centrifuger de 20 cc, des pipettes, pipettes Pasteur et graduées, un bain-marie à 37° ; toute la verrerie doit de préférence être siliconée.

Les produits utilisés sont : une solution de chlorure de sodium isotonique pour les lavages et la Streptolysine O de l'Institut Pasteur comme agent hémolysant.

Lavages -

Le plus tôt possible après le prélèvement le sang est mis à centrifuger à 1500 tours pendant 20 minutes.

Après élimination prudente du plasma, de façon à ne pas toucher la couche leucocytaire, nous réalisons deux lavages successifs avec 15 cc de sérum physiologique de manière à éliminer toute activité antistreptolysine.

Après le dernier lavage, on aspire le surnageant devenu clair et on obtient un culot globulaire dont on mesure le volume sur le tube à centrifuger gradué.

Destruction Erythrocytaire

Nous apportons alors à ce culot globulaire quatre fois son volume de streptolysine O. Cette streptolysine n'a subi auparavant aucune modification de dilution ni d'activation. Les premiers essais d'hémolyse de globules rouges nous ont montré que c'est avec ces mêmes proportions que nous obtenions la meilleure hémolyse : elle est alors totale et on obtient une bonne conservation de la morphologie des globules blancs. Le culot s'étale très bien.

Nous avions essayé des mélanges de streptolysine et d'eau distillée mais ils étaient nocifs pour les globules blancs qui restaient groupés et étaient difficiles à étaler, probablement sous l'influence des plaquettes qui amorcent la coagulation.

Après cette addition de streptolysine, nous remettons le culot en suspension et il est porté au bain-marie à la température de 37°. On agite de temps en temps jusqu'à hémolyse totale. Celle-ci est légèrement rapide ne dépassant pas en moyenne 10 minutes.

Recueil du culot

On soumet le tube à une centrifugation à 1500 tours minute pendant 8 minutes. On obtient alors le cu-

lot de globules blancs au fond du tube. Pour se débarrasser des stromas erythrocytaires on réalise de nouveau deux lavages successifs.

Le culot leucocytaire obtenu est ainsi à peu près pur. On l'aspire avec une pipette Pasteur et on l'étale en totalité sur plusieurs lames : en général huit ou dix sont nécessaires.

Les frottis sont séchés à l'air, puis colorés par la technique de Pappenheim.

2°/ *Examen de frottis* -

La lecture des lames dans son ensemble se fait au microscope ordinaire au plus faible grossissement. Les grossissements plus forts sont utilisés pour identifier les amas suspects ou les cellules anormales. Quand la manipulation est bien faite, l'hémolyse presque totale, on se trouve en face d'un tapis de cellules blanches disposées les unes à côté des autres peu altérées et faciles à identifier. On repère facilement les granulocytes neutrophiles éosinophiles, lymphocytes, de temps en temps un basophile.

Le plus souvent les polynucléaires ont perdu le contour de leur cytoplasme, mais leurs granulations se voient très bien. De temps en temps on rencontre de petits amas de granulocytes avec des plaquettes autour des dépôts de colorants.

C'est au milieu de ces champs uniformes de cellules sanguines qu'il faut rechercher les éléments anormaux ; ceux-ci se distinguent :

- soit par leur taille : mégacaryocytes et cellules tumorales
- soit par leur groupement : certains amas de cellules pouvant paraître particulièrement significatifs.

La manipulation est courte et simple, mais la lecture des frottis est parfois difficile à l'endroit où on examine l'étalement. Il peut exister de nombreux

artéfacts car les cellules examinées ont été manipulées, lavées et secouées.

La coloration, la centrifugation, l'agent hémolysant sont aussi des causes d'artéfacts nombreux, mais qui sont à la longue faciles à détecter.

Il nous faut surtout insister sur la longueur de la lecture des lames. Celles-ci sont quelques fois au nombre de 8 à 10. La rareté des éléments anormaux circulant dans le sang oblige à faire un "screening" le plus parfait possible et toutes les lames doivent être examinées.

DEUXIEME PARTIE

EXPOSE DES RESULTATS

Nous avons recherché des cellules tumorales dans le sang veineux périphérique de sujets atteints de tumeur maligne. Cette étude porte sur une trentaine de sujets hospitalisés pour CANCER.

Avant d'examiner ces frottis leucocytaires dans un but précis de recherche, il a été important de se familiariser avec la cytologie particulière de ces enrichissements et l'examen de frottis chez des malades non porteurs d'affection maligne a été nécessaire comme base et comme moyen de comparaison.

Ensuite nous avons examiné quelques culots leucocytaires de sujets atteints d'affection hématologique où il était intéressant de rechercher certains éléments rares tels que les cellules de Sternberge, les mégacaryocytes, cellules thrombocytogènes de la moëlle osseuse dont la présence a été détectée en petites quantités dans le sang circulant normal.

Nous avons chez ces trois groupes de sujets, essayé d'étudier la fréquence de ces mégagaryocytes et si possible mettre en évidence leur signification pathologique.

Nous avons donc divisé les malades à examiner en trois groupes :

1°/ groupe : sujets non atteints d'affection maligne : sujets tests ;

2°/ groupe : sujets atteints de cancer connu à son entrée dans le service ou diagnostiqué en cours de leur hospitalisation ;

3°/ groupe : sujets porteurs d'hémopathie ou de réticulopathie.

PREMIER GROUPE : Sujets non porteurs d'affection maligne mais porteurs d'affections très diverses. Ce sont des malades tests ; certains avaient un hémogramme perturbé.

Le tableau I indique le diagnostic anatomoclinique, les données hématologiques essentielles et surtout les particularités obtenues sur les frottis de leucoconcentration. (Voir tableau I).

ETUDE D'ENSEMBLE -

L'aspect des frottis est habituellement celui des leucocytes normaux et d'un film monocellulaire de lymphocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, au milieu desquels tranchent quelques amas plus ou moins compacts de leucocytes entourés de plaquettes. Le fond de la préparation comporte quelques stromas d'hématies formant des taches grises. Les monocytes souvent disposés en groupe de 10 à 20 restent en général à la périphérie.

Nous avons rencontré à côté de ces éléments de base des cellules inhabituelles aux frottis ordinaires.

Ce sont :
- des cellules sanguines jeunes de la série granulocytaire : promyélocytes et myéolocytes,
- des cellules à cytoplasme hyperbasophile : cellules de Türck, cellules plasmocytoïdes, quelques monocytes atypiques,
- des magacaryocytes : généralement réduits à l'état de noyau nu ou de fragments de noyau.

Nous avons rencontré également des cellules difficilement identifiables en raison de leurs altérations morphologiques et pouvant être considérés comme des images de cytolyse, ainsi que des cellules ricdériformes et des cellules binuclées.

GROUPE I

Sujets tests non porteurs d'affection maligne

SUJETS	DIAGNOSTIC	HEMOGRAMME - V.S.H	PARTICULARITES DU FROTTIS DE LEUCOCONCENTRATION
1 Bor...	Maladie polykystique du foie	H : 2.500.000 L : 5.400 Pn : 69 e : 8 b : 1 L : 14 Mm : 8 V.S.H. : 78	Mégacaryocytes nombreux : noyaux seulement
2 Des...	Insuffisance cardiaque	H : 2.400.000 L : 18.000 Pn : 94 e : 1 L : 1 Mm : 2 Mc : 2 V.S.H. : 71	0
3 Lag...	Cirrhose	H : 3.800.000 L : 7.600 Pn : 72 e : 3 L : 10 Mm : 8 Mc : 7 V.S.H. : 74	Promyélocytes Myélocytes Mégacaryocytes Cellules isolées non identifiées
4 Pot...	Mal de Bright	H : 2.500.000 L : 5.000 Pn : 72 e : 4 L : 17 Mm : 1 Mc : 6 V.S.H. : 135	Culot leucocytaire très difficile à étaler : nombreux artéfacts

5 Bla...	Pneumopathie chronique non bacillaire	H : 4.800.000 L : 5.200 Pn : 57 e : 3 L : 25 Mm : 9 Mc : 6 V.S.H. : 40	Quelques noyaux de Mégacaryocytes
6 Tan...	Bacillose pulmonaire	H : 4.300.000 L : 8.000 Pn : 57 e : 1 L : 15 Mm : 19 Mc : 8 V.S.H. : 27	0
7 Ver...	Pleuro-pneumopathie aiguë	H : 6.200.000 L : 10.000 Pn : 60 e : 1 L : 29 Mc : 10 V.S.H. : 40	Nombreuses confluences de leucocytes
3 Dep...	Pancréatite calcifiante	H : 4.200.000 L : 6.800 Pn : 73 e : 1 L : 20 Mc : 5 Mm : 1 V.S.H. : 60	0
9 Pic...	Syndrome dénutrionnel	H : 3.800.000 L : 15.000 Pn : 76 L : 12 Mm : 8 Mc : 4 V.S.H. : 40	0

10 Jan...	Névralgie cervico-brachiale	H : 5.200.000 L : 9.000 V.S.H. : 32	Pn : 68 L : 22 Mm : 7 Mc : 3	Quelques amas cellulaires

Il nous a paru fréquent d'observer des images de groupements de polynucléaires ayant l'air de converger vers vers un point central. A cet endroit ces cellules ont un aspect différent des autres éléments : noyau très ramassé, cytoplasme condensé. Par contre, nous n'avons jamais dans cette série de malades, rencontré de cellules jeunes de la lignée erythrocytaire.

Parmi ces quelques cas nous avons rencontré certaines difficultés d'étalement du culot : les leucocytes agglutinés étaient difficiles à dissocier. Ceci était surtout le fait d'enrichissements réalisés chez des sujets atteints d'affection grave et nous a paru pouvoir être rattaché à des modifications de la viscosité sanguine

Les manipulations qu'exigent la technique et l'action de la streptolycine peuvent donner lieu à de nombreux artéfacts qu'il est parfois difficile d'interpréter. Les cellules sont quelques fois exemptes de leur cytoplasme ou la membrane se distingue mal.

Pour illustrer ces difficultés, nous avons retenu deux cas que nous allons détailler davantage.

OBSERVATION N° 1 -

- Monsieur BOR.... 57 ans, hospitalisé pour hématenese et moelena était porteur d'une hépatomégalie sans altération des épreuves fonctionnelles hépatiques, on avait reconnu à l'examen laparoscopique une maladie polykystique du foie.

Les frottis de leucoconcentration de ce malade dont la formule leucocytaire (sujet N° 1, tableau I) était peu perturbée, étaient caractérisés par la présence en grand nombre de noyaux de mégacaryocytes. Cette observation nous a semblé intéressante à relater car, il est souvent difficile de distinguer ces gros noyaux hyperchromiques des cellules tumorales. D'autre part, elle montre qu'il existe des mégacaryocytes circulants chez des sujets non atteints d'affection maligne.

OBSERVATION N° 2 -

- Mme LAG ... hospitalisée pour cirrhose confirmée par P.B.F. (sujet N° 2, tableau N° I) présentait un hémogramme normal chez un cirrhotique.

La réaction chez elle était un frottis de leucoconcentration très riche en cellules inhabituelles. Il comprenait de nombreux promyélocytes, myélocytes, mégacaryocytes.

On observait en outre des cellules que nous n'avons pu identifier : très grosses à noyau occupant tout le cytoplasme, à chromatine très lâche et très fine, à membrane peu nette. Ces cellules pouvaient évoquer très nettement des cellules tumorales.

DEUXIEME GROUPE : Nous avons dans ce groupe rassemblé les sujets porteurs de cancer connu.

Nous avons noté la localisation primitive de la tumeur quand elle était connue, les métastases s'il y en avait, les critères de diagnostic.

Nous avons également mentionné, dans ce tableau les résultats du frottis de leucoconcentration :

- les cellules anormales
  celles qui nous paraissaient correspondre à des critères de malignité,
  celles qui nous paraissaient simplement suspectes.

- les mégacaryocytes, leur aspect, leur fréquence.
- la cytologie d'accompagnement : étude d'une réaction érythroblastique, granulocytaire, présence et fréquence des cellules hyperbasophiles.

(Voir tableau II) -

ETUDE D'ENSEMBLE -

Nous avons examiné les culots de leucoconcentration ou faible grossissement dans leur totalité. La rareté des cellules tumorales dans la circulation périphérique oblige à faire un "sceening" aussi parfait que possible. Sur le fond monotone des cellules banales, nous avons recherché les éléments et les amas cellulaires qui, par leur taille ou leur mode de groupement nous paraissaient correspondre aux critères de malignité : critères décrits par Papanicolaou dans l'étude de la cytologie exfoliative des épanchements, liquides biologiques, exudats etc ... chez lesquels on peut examiner des cellules isolées aussi bien que des cellules groupées dans un contexte cellulaire variable.

Nous avons eu quelques fois le bénéfice de comparer des cellules anormales rencontrées dans le sang aux cellules métastatiques trouvées dans la moëlle osseuse chez un même individu.

GROUPE II - CANCERS

Sujets	Motif Hospital.	Critères de diagnostic	Localisation primitive	Métastases connues	Particularités du frottis de leucoconcentration		
					Cellules anormales	Mégacaryoc.	Cytologie accomp.
11 Ser..	Adénopath. Jug. Images pulmon.	Ex. cytologique des crachats	Poumon	Ganglionnaires	0	0	0
12 Mar..	Images pulmon. (lacher de ballons)	Ex. Ana.pathol. Ph Ac : 57 UP	Prostate	Pulmonaires	1 très grosse cellule à noyau polylobé. ++	0	0
13 Gau..	Masse latéro-utérine	Ex. Radiolog. Ex. Clinique	Génitale ?	Pulmonaires Osseuses	Amas suspects	0	Cellules hyperbasophiles
14 Hen..	Hépatomégalie Images osseuses	Ex. Ana.pathol.	Digestive ?	Hépatique	Cellules isolées Amas suspects	0	0
15 Cau..	Synd.douloureux dorso-lombaire	Ex.cytologique de la moëlle iliaque	Rénale ?	Osseuses	Quelques amas ++	0	0
16 Cab..	Tumeur du cuir chevelu	Ex. Ana.pathol.	Cuir chevelu	Pulmonaires Osseuses	0	0	0
17 Maz..	Hémorragies intestinales	Ex. Ana.pathol.	Oesophage	0	4 amas ++	0	0
18 Chi..	Tumeur du sein	Ex. Clinique	Sein	Régionales hépatiques osseuses	2 amas de 50 cellules	présence	0
19 Ami..	Signes pulmon.	Ex. cytologique des crachats	Poumon	0	0	0	0
20 Fra..	Syndr.de conden. pulmonaire	Ex.bronchoscop.	Bronchique	Osseuses	2 grosses cellules	0	cellules hyperbasophiles

Sujets	Motif Hospital.	Critères de diagnostic	Localisation primitive	Métastases connues	Particularités du frottis de leucoconcentration		
					Cellules anormales	Mégacaryoc.	Cytologie accomp.
21 Exp..	Opacité hilaire	Ex. cytologique des crachats du liquide péricardique	Poumon	Péricardiques Digestives	Amas suspects	+	0
22 Bou..	Opacité pulmon.	Ex. Ana.pathol.	Poumon	0	0	0	0
23 Mou..	Douleurs radiculaires thoraciques	Ex. Radiologique Ex. Clinique	Prostate ?	Osseuses		Mégacaryocytes très nombreux entiers +++	Erythroblastose Myélocytose
24 Dor..	Signes d'extension d'un néo de l'éthmoïde énucléé	Ex. Ana.Pathol.	Ethmoïde	Régionales	Amas suspects	Quelques noyaux	Cellules hyperbasophiles
25 Sou..	Tumeur des parties molles du bras Tumeur médiastino pulmon.	Ex. Ana.Pathol. Ex. cytologique des crachats	Bras ? Poumon ?	Bras ? Pulmonaires ?	Amas suspects Lambeaux de tissus	Mégacaryocytes	Cellules basophiles
26 Bor..	Tumeur du testicule gynécomastie	Ex. Ana.Pathol.	Testicule ?	Pulmonaires ?	Très grosses cellules ++	0	0
27 Vic..	Adénopathies jugulaires	Ex.Cytol. de la moëlle	Poumon	Osseuses	Amas de cellules hyperbasophiles +++	0	Macrophages nombr. Erythroblastose +++ Monocytes à incl.
28 Sic..	Bacillaire Dyspnée	Ex. Ana.Pathol.	Bronchique	0	Quelques amas suspects	0	0
29 Cau..	Etat grave douleurs dorso-lombaires	Ex. Radiolog.	?	Hépatiques Osseuses	Cellules très grosses +	0	0

Sujets	Motif Hospital.	Critères de diagnostic	Localisation primitive	Métastases connues	Particularités du frottis de leucoconcentration		
					Cellules anormales	Mégacaryoc.	Cytologie accomp.
30 Les..	Epanch. pleural	Ex. cytologique de l'épanchement	?	Adénopathies jugulaires	0	0	0
31 Mor..	Héptomégalie	Ex. Ana.Pathol.	Digestif ?	Hépatiques	Cellules ricdériformes ++	0	0
32 Esc.	Heptomégalie tr. digestifs	Ex.Cytologique: moëlle	Prostate	Epiploon Osseuses	Amas suspects	Présence	0
33 Dea..	Diabète	Ex. Clinique Ex.Radiologique	Rectum	Osseuses	0	0	0
34 Ear..	Ictère	Ex.Ana. Pathol.	Sein ancien opéré	Hépatiques ?	0	Nombreux	Myélocytose Erythroblastose
35 Tao..	Dyspnée	Ex. Clinique Ex. Radiolog. Ph. Ac : 340 UP	Prostate	Osseuses	0	Quelques noyaux	0
36 Caz..	Mélanome opéré	Ex. Ana.Pathol.	Mélanome de la Région tempor.	Ganglionnaires	Nombreux amas +	0	0
37 Bar..	Mauvais état général	Ex.cytologique des épanchets.	Squirrhe atrophique du sein	Pulmonaires	0	0	0
38 Raz..	Douleurs vertébrales	Ex.radiologique	Poumon	Osseuses	Cellules très grosses ++	0	0
39 Bru .	Sciatalgie	Ex. Clinique Ex. Radiolog. Ph. Ac : 93 UB	Prostate	Osseuses Ganglionnaires	Cellules +	Méga. nombreux avec cytoplasme	Erythroblastose ++ Myélocytose
40 Bai..	Douleurs sternales	Ex. Ana.Pathol. Ex. Radiolog.	Sein opéré	Osseuses	Nombreux amas de 50 à 60 cell. ++	0	0
41 Fra..	Etat Sub-occlusif Ictère	Ex. Ana.Pathol.	Estomac	Hépatiques	Cellules hyperbas. suspectes	0	0

CRITERES DE MALIGNITE -

Il n'y a pas de critère isolé qui permette d'affirmer la malignité d'un ou de plusieurs éléments : c'est seulement sur un faisceau de caractères concordants que l'on est en droit de porter un diagnostic de présomption.

Si on se trouve en face d'une cellule isolée :

La cellule maligne métastatique est généralement beaucoup plus grosse que les cellules sanguines avoisinantes. Son rapport nucléo-cytoplasmique est le plus souvent élevé, mais celà n'est pas constant.

Le cytoplasme en général réduit, peut être basophile ou polychromatophile. Souvent ses contours sont peu nets, brumeux, avec des prolongements minces ; à l'intérieur, on peut rencontrer des inclusions diverses, parfois d'origine nucléaire.

Le noyau est généralement de grande taille. Sou-Souvent il est hyperchromique. Quelques fois, le réseau chromatinien est plus lâche mais il peut aussi être dense avec des mottes irrégulières, donnant à la cellule un aspect grimaçant. Il peut exister des nucléoles et dans ce cas le rapport nucléole-noyau est souvent élevé. Il peut aussi exister de grosses monstruosités nucléaires d'allure riédériforme.

Mais tous ces caractères ne sont ni spécifiques ni constants. Il peut y avoir des cellules cancéreuses naines et il est très vraisemblable qu'il existe des cellules mononuclées rencontrées dans le sang. D'autre part, il est souvent difficile de distinguer les cellules tumorales de cellules sanguines jeunes ou de mégacaryocytes plus ou moins altérées par la leucoconcentration.

a) Amas cellulaires ou "clumps"

Il s'agit en général de groupements de cellules de même nature, confluentes, quelquefois accolées. Il existe fréquemment une anisocaryose c'est-à-dire, confluence de noyaux de différentes grandeurs. Parmi elles se trouvent également des cellules binuclées ou à noyau polylobé. Cette anisocaryose hautement évocatrice n'est pas cependant un caractère spécifique ni constant. La forme de ces groupements est variable : les cellules peuvent être disposées en grappe, en ligne deux par deux, quelquefois en cercle ; ces amas donnent souvent l'image d'une véritable mosaïque tranchant sur le reste du champ.

Les auteurs anglosaxons ont appelé ces groupements cellulaires des "clumps", ou "clusters". Le nombre de cellules dans les clumps peut être variable, cinq, vingt, quelquefois cinquante. La fréquence de ces amas sur les lames est variable et il est important de noter que le plus souvent, ils sont groupés sur une lame ou deux.

Les "clumps" sont hautement évocateurs de métastases cancéreuses. Malheureusement il existe souvent de fausses images de "clumps" correspondant à des agglutinats de cellules et quelques fois on peut rencontrer des monocytes hyperbasophiles disposées en placards, plus rarement des îlots de cellules sanguines jeunes qui font penser à des cellules tumorales.

b) Cytologie d'accompagnement

L'examen des frottis de leucoconcentration permet en outre, tout au moins dans certains cas, d'observer des réactions cellulaires sanguines que l'examen de l'hémogramme n'avait pas décelé. C'est ainsi que nous avons pu reconnaître l'existence d'une érythroblastose, myélocytose, mégacaryocythémie, quelques fois isolées, quelques fois associées. Nous avons plus rarement observé une plamocytose véritable, mais très souvent des cellules hyperbasophiles en abondance. Ces dernières lorsqu'

elles sont de grandes tailles peuvent être difficiles à distinguer des cellules tumorales. Nous avons également rencontré parfois de nombreux macrophages et des monocytes porteurs d'inclusions diverses.

RESULTATS -

Nous avons examiné trente cas de cancers qui avaient été diagnostiqués de façon certaine soit à leur entrée dans le service, soit au cours de leur hospitalisation.

Nous avons rencontré des cellules anormales dans 12 cas sur 30 : certaines étaient très grosses et le plus souvent isolées, d'autres étaient groupées entre elles et avaient les caractères que nous avons décrit plus haut. Les cas positifs étaient des cas de cancers très avancés avec des métastases quelques fois multiples. Chez un malade porteur d'un cancer de l'oesophage et n'ayant pas de métastases cliniquement décelables, nous avons trouvé quelques amas.

Par contre, dans certains cas de cancers étant au stade terminal de leur évolution, nous n'avons rencontré aucun amas suspect.

Pour illustrer l'intérêt de la leucoconcentration, comme étant un élément de présomption dans le diagnostic du processus malin, nous avons retenu deux observations :

OBSERVATION N° 3 -

- Monsieur V.... Jean - 52 ans - (H.62/425) a été hospitalisé salle Widal, le 19 Février 1962, pour atteinte importante de l'état général, avec des signes bronchiques, toux quinteuse et dyspnée d'effort.

Le diagnostic d'épithélioma bronchique avait été évoqué en raison des signes de compression médiatinale dont l'existence d'une volumineuse adénopathie sus claviculaire dure et fixée et d'une opacité pulmonaire de la région sus hilaire droite.

La bronchoscopie avait montré une sténose incomplète de la lobaire supérieure. L'aspiration et la biopsie n'avaient pas permis de montrer de cellules néoplasiques.

L'hémogramme était H : 5 L : 8

Pn : 68 E : I L : 22 Mm : 3 Mc : 6.

Les frottis de leucoconcentration montraient :

- une nette érythroblastose,
- de nombreux amas de cellules hyperbasophiles. Ces cellules ne ressemblaient pas à des cellules sanguines et présentaient un asrect très suspect : cytoplasme flou très basophile, une légère anisocaryose : noyaux irréguliers et très hyperchromiques,
- autour de ces amas se trouvaient des macrophages de très grande taille et tous les monocytes du frottis étaient porteurs d'inclusions diverses particulières.

C'est sur l'observation de ce frottis qu'un myélogramme était pratiqué et montrait de nombreux amas de cellules néoplasiques métastatiques.

Le diagnostic de carcinomatose médiastino pulmonaire était donc très probable.

Le malade était d'ailleurs décédé quelques jours après dans un tableau évoquant une métastase préfontale.

Ce malade était donc porteur d'une crythoblastose que ne laissait pas prévoir sa formule sanguine absolument normale et était porteur de nombreux amas de cellules normales.

N.B. - Dans une observation à peu près analogue les auteurs anglais : FINKELL et TISCHOFF avaient retrouvé des amas suspects dans l'examen d'une goutte de sang pris au bout du doigt. Il s'agissait d'un cancer du poumon très virulent et des métastases vertébrales apparaissaient peu après.

OBSERVATION N° 4 -

- Madame C... Berthe - 63 ans - (H.62/271) avait été hospitalisée le 11 Février 1962 pour des algies dorsolombaires.

Les examens systématiques avaient mis en évidence des métastases osseuses diffuses, au niveau du bassin, du rachis dorso lombaire, de la colonne cervicale et du crâne.

Le diagnostic de maladie de Kahler avait été écarté par l'électrophorèse et le myélogramme. Les urographies avaient été très suspectes et il existait dans la région médiastinale droite, une image anormale d'interprétation difficile.

Le diagnostic de néo secondaire des os avait été porté, il est possible que le point de départ ait été un épithélioma du rein, à cellules claires, mais ceci n'avait pu être prouvé de façon formelle.

L'hémogramme était le suivant :

H : 5 L : 8,6

Pn : 78 : E L : 14 Mm : 2 Mc : 15 V S : 83

Le frottis de leucoconcentration a montré quelques amas de cellules hyperbasophiles. Les contours du cytoplasme étaient brumeux et il existait une légère anisocaryose. La ponction sternale n'avait pas permis de trouver des éléments anormaux, par contre, la ponction iliaque montra de nombreux amas de cellules métastatiques.

TROISIEME GROUPE : HEMOPATHIES ET RETICULOPATHIES

Nous avons réuni quelques sujets chez lesquels l'examen des culots de leucoconcentration pouvait mettre en évidence la présence de cellules rares qui auraient pu migrer dans le sang périphérique : cellules de Sternberg, mégacaryocytes, cellules réticulaires, cellules néoplasiques. (Voir tableau III).

RESULTATS -

Nous avons retenu dans ce tableau trois cas qui nous ont paru intéressants :

OBSERVATION N° 5 -

- Monsieur B..... Gino 40 ans, présentait une lymphogranulomatose maligne prouvée par l'examen histologique d'une adénopathie.

Sa maladie datait du mois de Juillet 1961, il avait été traité par la radiothérapie sur les champs axillaires et jugulaires, au mois de septembre et octobre 1961.

Son état était demeuré satisfaisant jusqu'au mois de Mars 1962, où une tuméfaction était apparue s'accompagnant d'un prurit intense et rebelle et de névralgies brachiales. Il avait été traité alors par l'ENDOXAN, puis la radiothérapie. L'amélioration avait été minime, l'adénopathie s'étant fistullisée.

L'étude du frottis de leucoconcentration pratiquée à ce moment même nous a permis d'observer de l'ensemble des frottis. Ces cellules étaient mononucées, certaines avaient des nucléoles énormes. Le cytoplasme basophile portait des inclusions rassemblées dans un pôle. Ces caractères cytologiques étaient suffisants pour permettre d'affirmer qu'il s'agissait de cellules de Sternberg. La cytologie d'accompagnement n'apportait rien de particulier.

L'hémogramme était le suivant :

H : 4,2 L : 11

Pn : 75 E : I L : 14 Mm : 10 V.S : 64

Le malade est sorti dans un état grave : il était atteint d'une forme particulièrement évolutive de lymphogranulomatose maligne.

GROUPE III

Sujets atteints d'Hémopathie et de Réticulopathie

SUJETS	DIAGNOSTIC	HEMOGRAMME	MYELOGRAMME	PARTICULARITES DU FROTTIS
42 Fek...	Réticulose maligne	H : 5.500.000 L : 8.000 Pn : 92 e : 1 L : 1 Mm : 1 Mc : 4 Pl. : 250.000		Quelques grosses cellules isolées hyperbasophiles à rapport nucléocytoplasmique
43 Ber...	Leucémie myéloïde chronique	H : 3.700.000 L : 4.200 Pn : 40 e : 3 b : 3 L : 3 Mc : 4 Myéloblastes : 4 Myéloneutro. : 5 Métamyéloneutro. : 8 Pl. : 70.000	Gr. : 99 % Hyal. : 0,6 % Norm. : 0,4 %	Absence de mégacaryocytes
44 Gay...	Leucémie lymphoïde chronique	H : 1.900.000 L : 1.800.000 Pn : 11 L : 76 Mc : 13 Pl. : 68.000	Lymphocytes 98,6 % Lymphoblastes 0,4 % Autres cell. 2 %	0
45 Bel...	Splénomégalie myéloïde	H : 1.400.000 L : 1.800 Pn : 48 b : 1 L : 37 Mm : 6 Leucoblastes : 2 Myéloneutro. : 17 Monoblastes : 17 Pl. : 60.000	Absence	Très nombreux mégacaryocytes

SUJETS	DIAGNOSTIC	HEMOGRAMME	MYELOGRAMME	PARTICULARITES DU FROTTIS
46 Bell...	Maladie de Hodgkin	H : 4.400.000 L : 11.000 Pn : 75 e : 1 L : 14 Mm : 10 Pl. : 240.000		Nombreuses cellules de Sternberg (40 environ)
47 Essb...	Maladie de Kahler	H : 2.300.000 L : 9.000 Pn : 37 e : 1 L : 39 Mm : 16 Myéloneutro. : 7 Erythrob. : 76% Pl. : 31.000	Gr. : 27 % Hyal. : 35 % Plasm. : 6 % Normob. : 37 %	Pas de plasmocytes typiques De nombreuses cellules non identifiées
48 Mau...	Leuco-erythro-myélose avec thrombocythémie	H : 4.200.000 L : 12.000 Pn : 45 b : 9 e : 4 Myélob. : 20 Promyélo. : 2 Myélon. : 1 Métamyélon. : 2 Normob. : 4% Pl. : 1.800.000	Gr. : 77,2 % Hyal. : 9,6 % Normob. : 14,2 %	Mégacaryocytes nombreux entiers et polymorphes
49 Sos...	Leucoconeutropénie	H : 4.500.000 L 2.900 Pn : 68 e : 2 L : 5 Mm : 14 Mc : 9 Pl. : 180.000	Gr. : 15,5 % Hyal. : 42 % Plasm. : 13,8 % Normob. : 42,2 %	6 amas de cellules très suspectes. TISSU ?

OBSERVATION N° 6 -

- Madame M ... Marie Jeanne, a été hospitalisée dans le service du 11 au 15 Décembre 1961, pour bilan d'une hémopathie sévère.

Elle présentait des antécédents bacillaires anciens, mais indiscutables ; à la fin du mois d'Août elle accusait de curieuses paresthésies des membres inférieurs.

Un bilan hématologique pratiqué fin Octobre montrait une anémie avec leucocytose, thrombocytose et érythroblastose.

A l'entrée dans le service, elle ne présentait ni purpura, ni adénopathie, l'état général était satisfaisant, mais les examens hématologiques ont mis en évidence d'importants désordres myéloprolifératifs intéressant les trois lignées :

- anémie modérée à 4 200 000 avec érythroblastose sanguine à 4 %
- leucocytose discrète à 12 600
- mais présence dans le sang de nombreux éléments immatures de la série granulocytaire.
- Thrombocytose considérable : plaquettes 1 680 000
- la morphologie et la valeur fonctionnelle des plaquettes paraissaient normales.

Cette leuco-érythro-myélose aiguë, a été traitée en raison des antécédents bacillaires, par les antibiotiques anti-tuberculeux.

L'examen du frottis de leucoconcentration montrait des mégacaryocytes en très grand nombre, un ou deux par champ au faible grossissement. Tous les stades de la maturation de ces cellules étaient observés. Ils paraissaient normaux.

Malheureusement la malade n'a pas été revue dans le service.

OBSERVATION N° 7 -

Madame S... Anaïs 79 ans, a été hospitalisée dans le service le 3 mai 1962, pour leuconeutrophénie paraissant idiopathique. Cependant, le myélogramme a montré une diminution marquée de la lignée granulocytaire et une réaction plamocytaire. La radiographie pulmonaire a mis en évidence une opacité segmentaire, si bien que le diagnostic de myélose néoplasique a été un instant retenu.

La recherche de cellules néoplasiques dans les crachats par inclusion, dans les sécrétions bronchiques après bronchoscopie et dans le sang veineux par la leucoconcentration s'est montrée négative.

Après un séjour de repos au service des convalescents, Madame S... a été hospitalisée à nouveau le 16 Mai en raison de l'apparition d'un zona cervico-occipital gauche, avec paralysie faciale périphérique.

Le leucopénie persiste, le myélogramme montre encore une sidération de la lignée granuleuse, une réaction plasmocytaire modérée et érythroblastose importante.

L'existence d'une néoplasie sous-jacente est à nouveau recherchée, et une recherche des cellules malignes est pratiquée dans le sang veineux périphérique. Les frottis de leucoconcentration ont montré de très nombreux amas d'assez grosses cellules, ces cellules étaient groupées de telle manière que par endroits elles prenaient l'aspect d'un véritable tissu par leur agencement concentrique autour d'une lumière centrale.

Malheureusement la malade est décédée le 16 Juin 1962 dans un tableau de collapsus, sans que l'on ait pu remettre en évidence la néoplasie qui était vraisemblablement à l'origine de son agranulocytose.

La preuve de la néoplasie n'était pas faite, nous ne pouvions que faire des suppositions devant ces images très évocatrices.

Etait-ce un groupe de cellules malignes ? Etait-ce un fragment de tissu quelconque qui migrerait à l'occasion de processus cancéreux ?

Cette observation rend compte de difficiles problèmes que posent certaines images rencontrées au cours de la leucoconcentration.

Dans ce même groupe, nous avons rencontré chez un malade porteur de reticulose maligne de nombreuses cellules isolées assez grosses, hyperbasophiles à rapport nucléo- cytoplasmique élevé.

RESULTATS DE LA FREQUENCE DE LA MEGACARYOCYTHEMIE

Nous allons dans un dernier tableau essayer de montrer la fréquence des magacaryocytes circulants.

	Nombre de sujets	Présence de mégacaryocytes
Groupe I	10	3
Groupe II	30	8
Groupe III	8	2

Nous avons rencontré dans le groupe I sujets tests non atteints d'affection néoplasique des magacaryocytes dans 3 cas sur 10. Il s'agissait de noyaux nus ou de fragments de noyau.

Dans le groupe II où sont rassemblés les sujets atteints de cancer nous avons trouvé des mécacaryocytes dans 8 cas sur 30.

Dans deux cas de métastases osseuses diffuses le nombre de mégacaryocytes rencontrés sur le frottis nous a paru très augmenté. Ils étaient absolument intacts du point de vue morphologique, c'est-à-dire qu'ils comprenaient outre leur noyau un cytoplasme abondant et facilement identifiable, alors, que dans les autres cas nous remarquions seulement des noyaux nus ou des fragments de noyaux. Cette mégacaryocythémie était accompagnée d'une érythroblastose et d'une myélocytose dans un cas, d'une myélocytose seule dans un second cas.

Chez les sujets du groupe III, nous avons observé de nombreux mégacaryocytes dans une splénomégalie myéloïde avec ostéo-myélo-sclérose et dans une leuco-érythro-myélose avec thrombocythémie (observation N° 6).

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION

A la lumière de nos résultats comparés à ceux des différents auteurs qui se sont attachés à ce problème, nous allons essayer de déterminer l'intérêt diagnostic et pronostic de la recherche des cellules néoplasiques par la leucoconcentration.

Ensuite, nous aborderons le problème de la recherche des cellules de Sternberg dans le diagnostic et l'évolution de la maladie de Hodgkin.

Nous essaierons d'autre part, de déterminer l'intérêt de cet examen dans l'étude de la mégacaryocythémie au cours des néoplasies et de certaines affections hématologiques.

RECHERCHE DES CELLULES NEOPLASIQUES

a) - Intérêt diagnostic -

Nous avons trouvé des cellules néoplasiques dans 12 cas sur 30. Il s'agissait soit de cellules isolées soit de cellules groupées en amas. Dans 8 cas, nous avons rencontré des amas suspects : ils étaient abîmés par la streptolysine ou agglutinés par les différentes manipulations. Dans les 12 autres cas nous n'avons absolument rien trouvé.

Nous allons dans un bref résumé, rappeler les différents travaux entrepris à ce sujet qui nous ont permis de guider notre travail :

Grove chez des enfants atteints de tumeurs malignes sarcomateuses trouve 11 cas positifs sur 20.

Stuart Roberts trouve 10 % de cas positifs dans des cas curables et 30 % dans des cas incurables. Ils ont trouvé des "Clumps" de 65 cellules dans le sang périphérique de néoplasmes digestifs.

Le Roy Long, Jonasson, examinant 178 sujets atteints d'affection néoplasique trouvent 25 % de cas positifs chez des malades curables et 39 % chez les incurables.

Alexander et Spriggs trouvent des chiffres supérieurs à 10 % aussi bien dans le sang périphérique que dans le sang local d'une tumeur. Les auteurs insistent sur la difficulté du cyto diagnostic et la confusion qui peut être faite avec des cellules sanguines immatures.

Pruitt et Hilberj sur 100 examens trouvent 39 cas positifs.

Potter sur 255 cas examinés trouve 79 cas positifs.

Raker et Taft, trouvent seulement 2 cas positifs certains sur 145, insistent sur l'importance de la mégacaryocythémie, chez les cancéreux et les difficultés de diagnostic différentiel, que posent ces différentes cellules.

Herbeuval et Col trouvent 31 cas positifs sur 52.

De Brux 1 seul cas positif certain sur 15 néodigestifs, insiste sur la difficulté du diagnostic cytologique : certains éléments histiocytaires peuvent être confondus avec des cellules tumorales.

Dargent, Faucon sur 46 cancers du sein trouvent 6 résultats positifs certains et sur 19 mélanomes 11 cas positifs. Ils trouvent surtout des amas de cellules et remarquent la présence de cellules macrophages.

Chone rencontre 2 résultats certains sur 91 cas examinés et choisis de façon très disparate. Il s'agit d'une lymphogranulomatose et d'un mélanome.

Ludwig dans le sang des cavités cardiaques de malades morts de cancer trouvent des cellules atypiques dans 10 sujets sur 45.

Gastpar sur 145 cas de tumeurs d'origine oto-rhino-laryngologiques trouve 128 cas positifs, 13 cas négatifs et 4 cas douteux.

Paldus dans 30 cas de cancer avancé rencontre 2 cas positifs.

Sheinin (Finlande) sur 91 malades trouve 3,3 % de cas positifs et 10,3 % de cas douteux.

Ishikawa compare les méthodes de fluorescence par acridine orange et les méthodes de coloration habituelle par le May-Grunwald-Giemsa. Il rencontre 47 cas positifs sur 70. Les résultats de la méthode par l'acridine orange sont à peu près superposables à ceux des colorations normales. Cette méthode amène un gain très important de temps pour la lecture des frottis. Mais il faut faire une comparaison très rigoureuse avec les lames colorées par le Giemsa car ces cellules hyperbasophiles non tumorales, plasmocytes par exemple peuvent donner la fluorescence.

Izucki et Col sur 81 cas de cancer trouvent 18,5% de cellules atypiques mais sur 21 cas de tumeurs bénignes 9,5 % de cellules atypiques.

Il semble donc que l'intérêt diagnostic de cet examen soit assez restreint dans le diagnostic du cancer, car il y a un faible pourcentage de cas positifs chez des sujets atteints de néoplasie avancée. Cependant, dans certains cancers microscopiques à évolution rapide et dans des tumeurs inaccessibles aux moyens de détection habituelle celà peut être un élément de présomption intéressant, un élément de présomption seulement car :

- LE CYTODIAGNOSTIC EST DIFFICILE.

1) Il n'y a pas de critères bien spécifiques qui puissent, du point de vue morphologique permettre d'affirmer un diagnostic de malignité. Les cellules sont souvent

abimées par les manipulations et les agents qui éliminent les globules rouges.

2) Ces mêmes cellules, quand elles arrivent dans le sang périphérique après des passages successifs parmi des capillaires étroits et étant dans un milieu inhabituel peuvent changer de formes et être difficilement reconnaissables : on peut avoir des images de dégénerescence et d'autolyse. Des cellules comprenant des noyaux sans cytoplasmes sont difficiles à identifier.

3) Dans l'appréciation de ces critères de malignité, il y a un élément subjectif important. En effet, les résultats énumérés par différents auteurs sont peu concordants. Dans le sang périphérique, les auteurs rencontrent des cellules malignes dans 1/3 des cas environ mais il y en a certains qui annoncent des chiffres inférieurs à 5%. Par contre, d'autres annoncent des chiffres supérieurs à 70 %.

Le choix des malades, le moment et le lieu de l'examen semblent être des éléments pouvant faire varier les pourcentages de cas positifs. Il faudrait peut-être des examens répétés chez un même malade pour capter le ou les passages de cellules dans la circulation.

Peut-être l'emploi de méthodes nouvelles, par exemple les colorants fluorescents nous permettront de détecter un plus grand nombre de cellules de façons plus sûres et la rapidité du screening favorisera l'examen de plus grandes quantités de sang et ainsi augmentera le nombre de chances de rencontrer des cellules métastatiques.

b) - Intérêt pronostique -

La majorité des auteurs qui ont travaillé à ce problème l'on fait dans un but pronostique.

Nous mêmes n'avons pas essayé de déterminer cet intérêt : le nombre de cas examinés était trop restreint et nous n'avons pas eu assez de recul pour juger de certains cas. Cependant, il nous a semblé qu'un très grand nombre de cellules atypiques rencontrées sur les frottis semble en faveur d'un très mauvais pronostic, et les cas positifs que nous avons rencontrés sont des cancers avec métastases.

Par contre, nous avons remarqué et beaucoup d'auteurs ont reconnu que dans les néoplasies très avancées, on peut ne pas rencontrer de cellules dans le sang.

Nous allons essayer de réunir les avis des différents auteurs qui se sont attachés à chercher l'intérêt pronostique de la présence de celles cellules.

Engell (Danemark) recherchera surtout les cellules tumorales dans le sang efférent d'une tumeur au cours d'opérations chirurgicales. Il trouve des éléments anormaux dans 41 cas sur 71 dans le sang efférent et 11 cas positifs sur 79 dans le sang périphérique. Cet auteur a mis en vedette la nocivité de l'acte chirurgical car il libère des cellules dans la circulation. Cette carcinhémie n'est pas obligatoirement responsable de métastases car des malades examinés après un recul de cinq années et qui étaient porteurs de cellules au moment de l'opération ne présentaient pas de signes de récidives.

Il y a d'autre part, un pourcentage beaucoup plus faible de cellules dans le sang périphérique par rapport à celui trouvé dans les veines locales d'une tumeur.

Sandberg et Moore, trouvent 87 cas positifs sur 551 sangs périphériques. Après des examens de contrôle, ces auteurs pensent qu'il y aurait une diminution de la survie de ces malades, mais que celà n'entraîne pas obligatoirement une échéance fatale. Le pronostic fait sur la présence de telles cellules peut être modifié par la chirurgie d'exérèse. Dans l'évolution du processus malin il faut tenir compte de la nature des cellules, de leur nombre, de leur pouvoir d'infestation, de leur viabilité

de même les facteurs de résistance de l'hôte jouent un rôle important.

Stuart Roberts pense qu'il y a un rapport entre le traumatisme chirurgical et la présence de cellules dans le sang périphérique. Il pense que celles-ci arriveraient dans les veines du pli du coude après des filtrages successifs, foie, poumons, capillaires périphériques. Ces passages dans ces organes filtres se feraient peut-être par mouvements amoeboïdes à travers des shunts artério-veineuses ou par des modifications du calibre des vaisseaux.

Drye et Rumage étudient dix sept malades judicieusement sélectionnés ayant fait l'objet d'investigations et essaient de déterminer la signification pronostique de la présence de ces cellules dans le sang. Sur quatre cas examens négatifs, plusieurs fois répétés concordaient avec une absence de récidive. Dans un deuxième groupe de malades de cellules dans le sang s'étaient manifestées de 1 à 16 mois avant le diagnostic de rechute. Pour un autre groupe de malades des cellules étaient constatées de 15 mois à 2 ans avant l'apparition de récidive. Il y aurait d'après ces auteurs un grand intérêt pronostique lié à la présence de ces cellules dans le sang.

D'autres auteurs n'ont pu reconnaître après des examens nombreux et répétés une corrélation entre le nombre de cellules, le type de cancer, le pronostic (Meiamed, Seal). D'autres semblent avoir prévu à l'avance l'apparition de métastases (Drye, Rumage).

Cependant on peut dire que la présence de cellules anormales dans le sang n'a pas de signification péjorative obligatoire ; des éléments anormaux lancés dans la circulation au cours d'opérations chirurgicales n'ont pas donné de métastases (Engell).

L'agressivité et le nombre de cellules interviennent pour une grande part dans l'éclosion des métastases, leur nature, leur indifférenciation surtout sont l'apanage des éléments les plus métastasiants. (Moore).

Le devenir de ces cellules tumorales lancées dans la circulation pose aussi les nombreux problèmes des relations hote-tumeur. L'organisme met en jeu des moyens de défense contre cet envahissement comme il le ferait devant toute agression. Dans certains cas ces moyens sont stimulés : ces cellules sont détruites dans le sang circulant peut-être à l'aide de cellules sanguines: les polynucléaires par exemple (Redon) où meurent d'elles-mêmes dans un milieu hostile. Certains organes comme le foie et le poumon qui sont souvent le siège de métastases peuvent aussi détruire ces cellules quand leur nombre n'est pas trop élevé. On a retrouvé dans le poumon des embolies néoplasiques abortives. Les moyens de défense nombreux, qu'ils soient cellulaires, immunologiques ou hormonaux régissent l'envahissement plus ou moins grand de ces cellules qui dans certains cas sera irrémédiable, dans d'autres cas sera neutralisé.

RECHERCHE DES CELLULES DE STERNBERG -

A l'aide des techniques de leucoconcentration, nous avons mis en évidence des cellules de Sternberg dans le sang périphérique d'un malade atteint d'une maladie de Hodgkin au cours d'un épisode aigu.

Cette migration cellulaire dans la circulation avait été démontrée dans les formes aiguës Marchal et Col examinant plusieurs malades à plusieurs stades de leur évolution trouvent des résultats positifs dans plus de la moitié des cas. Ces auteurs ont comparé systématiquement les ponctions ganglionnaires et la leucoconcentration et les résultats ont montré : 13 leucoconcentrations positives et 14 ponctions positives sur 20 cas examinés. Cette méthode aurait une importance diagnostique surtout dans les cas d'absence de ganglions superficiels. Elle présenterait aussi un intérêt dans les tests d'évolutivité.

On peut trouver des formes jeunes mononuclées et

des formes plus évoluées à plusieurs noyaux, mais celles-ci en général sont abimées par la centrifugation.

RECHERCHE DES MEGACARYOCYTES CIRCULANTS -

La leucoconcentration a permis de découvrir la présence de mégacaryocytes circulants dans le sang. Nous avons étudié leur fréquence chez la totalité des sujets que nous avons examinés. Celle-ci ne nous a pas paru avoir de signification particulière car, les pourcentages trouvés dans les trois différents groupes examinés nous a paru à peu près équivalent. D'autre part, un nombre trop restreint de cas examinés ne nous a pas permis de conclure à une signification pathologique. Souvent la présence de mégacaryocytes rencontrés en grand nombre sur les frottis de sang de cancéreux nous a posé de difficiles problèmes de diagnostic différentiel avec les cellules tumorales.

Parmi les auteurs qui se sont attachés à une étude systématique de la mégacaryocythémie nous citerons Herbeuval et Col. Ils ont observé des mégacaryocytes chez des sujets normaux. Il existe donc une mégacaryocythémie physiologique. Il s'agit en général de noyaux nus. Ils seraient en plus grand nombre chez les hommes que chez les femmes.

Une nette augmentation peut être appréciée chez les sujets cancéreux.

Raker et Taft ont trouvé des mégacaryocytes chez 42 % des sujets examinés pour rechercher des cellules tumorales.

Herbeuval et Col ont démontré cette augmentation surtout nette dans des cancers arrivant au terme de leur évolution. D'après ces auteurs, cette fréquence serait plus grande dans les métastases osseuses de cancer de la prostate et du sein. Dans ces cas les mégacaryocytes sont entiers, leur cytoplasme est intact et on les iden-

tifie très bien. Dans le sang de ces sujets il existe en même temps une nette réaction érythroblastique et myélocytaire, des modifications radiologiques de la structure osseuse.

Leur nombre peut se trouver augmenté dans d'autres types de tumeurs : sarcome d'Awing, lymphosarcome, réticulosarcome.

Pour distinguer les mégacaryocytes des cellules tumorales Herbeuval et Col ont mis au point un sérum antiplaquettes fluorescent. Jackson emploie l'acridine orange colorant fluorescent qui distingue très bien ces deux catégories de cellules.

Dans les syndromes myéloprolifératifs

Leucose aiguë, leucémie myéloïde chronique, érythromyélo-leucose, la présence de mégacaryocytes est assez fréquente.

Dans les leucémies myéloïdes chroniques : leur présence serait contemporaine d'une poussée aiguë terminale ou d'une simple aggravation du processus. Marchal et Col en ont observé dans 14 cas sur 22.

Dans les splénomégalies myéloïdes avec ostéomyélosclérose, ces mêmes auteurs ont rencontré 5 fois sur 8 des mégacaryocytes et des mégacaryoblastes en abondance dans le sang. Cette augmentation est contemporaine d'une myélocytose et d'une érythroblastose. En général elle est d'un mauvais pronostic.

D'une manière générale cette mégacaryocythémie, quand elle est très importante, quand des cellules intactes circulent dans le sang signe un grave désordre de la moëlle osseuse : ce désordre peut être d'origine leucosique ou d'origine néoplasique par exemple dans certaines métastases osseuses de cancers ostéophiles comme celui de

la prostate et du sein.

D'autre part, toutes les causes pouvant provoquer de l'ostéomyélosclérose sont susceptibles de déterminer un passage de mégacaryocytes dans la circulation sanguine.

CONCLUSIONS

L'objet de ce travail a été de mettre au point une technique simple et assez rapide pour la recherche des cellules anormales dans le sang périphérique de sujets porteurs de tumeurs malignes. Nous avons en effet rencontré ces cellules isolées ou groupées en amas, chez de tels malades.

L'intérêt pratique de cet examen dans un but diagnostique n'a pu être déterminé. Il ne semble pas qu'il puisse être d'un apport considérable car on se heurte à des difficultsé d'identification dues d'une part à la technique, d'autre part à la présence de cellules dont l'absence de critères bien définis permet parfois de soupçonner mais rarement d'affirmer la malignité.

Notre bilan apparaît donc un peu décevant car le pourcentage de cas positifs est minime relativement à la longueur et la difficulté de l'examen.

Cependant, il est possible que des méthodes nouvelles d'identification histochimique telles que l'emploi des colorants fluorescents puisse permettre une identification plus rapide et plus sûre de ces cellules anormales et ainsi augmenter le pourcentage de cas positifs en examinant de plus grandes quantités de sang.

Nous ne pouvons davantage conclure sur l'intérêt pronostique, recherché par les nombreux auteurs qui se sont attachés à ce problème. Le nombre de cas examinés est trop restreint et l'impossibilité de contrôler l'évolution de certains malades ne nous donnent pas le droit de conclure à une incidence thérapeutique ou pronostique.

Il semble néanmoins intéressant de s'attacher à ce problème de cellules circulantes, de leur aspect, de leur devenir, de leur incidence dans la production de

métastases et même d'envisager les nombreux problèmes qui se posent sur les réactions de défense que semble mettre en oeuvre l'organisme devant ces cellules nombreuses et agressives.

La présence de mégacaryocytes dans le sang circulant, nous a amenée d'autre part à envisager quelle pouvait être leur signification au cours de certaines néoplasies et affections hématologiques où leur nombre paraît augmenté.

La leucoconcentration pourrait aussi avoir un intérêt dans le diagnostic et l'évolution de la maladie de Hodgkin, cependant, les mêmes difficiles problèmes d'identification se posent devant ces grandes cellules qui se trouvent isolées dans le sang.

Seule la confrontation des résultats des frottis de leucoconcentration et des examens histologiques réalisés après biopsie ou nécropsie dans un grand nombre d'observations de cancers ou de réticulopathie, permettra de porter un jugement sur la valeur diagnostique et pronostique de cette technique cythologique.

Vu : Le Président,
GADRAT.

Vu : Le Doyen,
LAZORTHES

Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 12 Décembre 1953
Le Recteur
Président du Conseil de l'Université,

A. LOYEN

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALWIN L. - WATNE A.L. - AVERY A. SANDBERG & GEORGE MOORE -
"The pronostic value of tumor cells".
Arch - SURGERY 1961, 83, 190

2 - ASHWORTH T.R. -
"A case of cancer in which cells similars to those in the tumor, were seen in the blood after death.
Australian med J. 1869, *14*, 146

3 - BALDUS F. -
"Uber den Nachweiss von tumorrellen im strömen den blut".
Klin. Wschr. Dtsh. 1960, *38*, 845-846

4 - DE BRUX J. & ANCLA Micheline -
"Recherche des cellules cancéreuses dans le sang circulant".
Presse médicale 1960, *68*, 1397

5 - BOUVIER CH. - MAURICE P.A., ROCH R. -
"Nature des cellules anormales trouvées dans le sang circulant en présence d'affections tumorales".
Oncologia 1962, *15*, 122-139

6 - CHONE B., BECCKER J. -
"Klinische Ergelsnisse der Tumorell diagnostik in peripheren Blut".
Stralhenthérapie 1961, *115*, 406

7 - DELARUE -
"Le problème biologique du cancer"
Paris 1947. Mass. Edit.

8 - ENGELL H.C. -
"Cancer cells in circulating blood"
Acta Chirug. Scand. 1955, supp. 201, 1-70

9 - ENGELL H.C. -
"Cancer cells in the blood. A five to nine year follow up study"
Ann Surgery 1959, *149*, 457-461

10 - ERFATI P., ROSENSZGIR -
"Buffy coat in normal human adults"
Blood 1960, *16*, 1 1012-1019

11 - FAUCON M., DARGENT & POMMATAU -
"Recherche des cellules tumorales dans le sang circulant"
Rev. Lyon. Med. 1961 - *10* - 943-960

12 - FAUVET Jean -
"Les métastases cancéreuses"
Revue Prat. 1961 *10* - 2387-2402

13 - FINKEL.G.C. & TISHOFF Ch.
"Malignant cells in peripheral Blood smear ; report of a case"
New Eng. J. Med. 1960, *262*, 187-188

14 - FREY -
"On the problem of tumor cells in the peripheral blood"
Stralhenthérapie 1961, *114*, 622-662

15 - GASPAR H. -
"On the problem of methodology and demonstration of tumor cells in peripheral Blood"
Munch. Med., Woche. 1961, *103* - 2416 - 2420

16 - GOLD P. COLE M.
"Simple method for leucocytes separation".
Journal lab. clin. Méd. 1960, *56*, 310

17 - GRABER FRITZ -
"Dépistage de cellules cancéreuses dans le torrent sanguin de l'homme".
Revue des progrès thérapeutiques 1960, *88*, 92

18 - GROVE W.J. - WATNE A.A. - JONASSON O.M. and ROBERTS S.S. -
"Vascular dessimination of cancer in children".
A.M.A. Arch. surg. 1959, *78*, 628

19 - HERBEUVAL R. - HERBEUVAL H. - CUNY Q. - DUHEILLE J. -
"Recherche des cellules cancéreuses dans le sang et les liquides d'exsudats par la leucoconcentration".
Presse médicale 1961, *69*, 149-152

20 -HERBEUVAL - J. DUHEILLE - CUNY Q. -
"La mégacaryocythémie physiologique. Passage d'îlots mécacaryoblastiques, et érythroblastiques dans le sang circulant".
C.R. Soc. Biol. 1962, *156*, 121-126

21 - HERBEUVAL R. - HERBEUVAL H. - DUHEILLE J. -
"La leucoconcentration dans les leucémies myéloïdes".
Semai. Hob. 1962, *67*, 2750-2755

22 - HIROSHI SAITO -
"Studies on cancer cells on the circulating blood".
Acta Medica et Biologica 1961, *123*, 131-149

23 - HIROSHI SAITO -
"Experimental study on the fate of intra portally injectec tumor cells and metastasis formation".
Acta Medica & Biologica 1961, *123*, 151-173.

24 - HERMAN A. -
"Der Tumorzell nachweiss im blut und seine bedeuntung für die Klinik"
Arch. Ohrem. Nasen U. Kehlkopfheilkde 1961, *178*, 263-268

25 - HERMAN A. -
"Klinishe und experimentelle unter suchungen über den Nachweiss von tumorzellen im strömenden blut".
Arch. Orhem. Nasen U. Kehlkopfheilkde Dtsch 1960, *176*, 536-544

26 - JECKSON J.F. -
"Histochemical identification of megacaryocytes from peripheral blood exemined for limor cells"
Cancer 1962, *15*, 259-262

27 - JAMMES C., DRYE M.D., WILLIAM T., RUMAGE JR., MD. DOROTHY Anderson -
"Pronostic import of circulating cancer cells after surgery".
Annals of surgery 1962, *155*, 733-740

28 - JUHLIN L., SHELLEY W.B. -
"Plastic tube technic of centrifugal separation of leukocytes from human blood"
Blood 1961, *18*, 477-480

29 - KUPER S.W.A. - BIGNALL J.E. L'UCKCOK E.D. -
"A quantitative method for studying tumor cells in blood".
Lancet 1961, 7182, 852

30 - LALEZARI P. -
"A new technic for the separation of human leukocytes"
Blood 1962, *19*, 109-114

31 - LE ROY LONG, ROBERT'S S., MAC GRATH, MAC GREW E. -
"Simplidief technique for separation of cancer cells from blood"
J.A.M.A. 1959, *170*, 1785-1788

32 - LE ROY LONG - JONASSON O. -
"Cancer cells in blood"
Arch. Surg. 1960, *80*, 910-919

33 - LI JE & OSGOOD E.E. -
"A method for the rapid separation of leucocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow which a phyto hemagglutinone from red beans"
Blood 1949, *4*, 670

34 - LUDWIG J. -
"Queschwulstzellen im leichen blut".
Arc. Virshows. Pathol. anat. Physiol. 1961, *344*, 419-427

35 - MALM GREEN - PRUITT - DEL VECCHIO and POTTER -
"A method for the cytologie detection of tumor cells in the whole blood".
Journal of the national cancer institute 1958, *6*, 1203-1213

36 - MALMGREEN - POTTER -
"Cancer cells in the circulating Blood"
Southern medical journal 1959, *11*, 1359-1362

37 - MARCHAL G., PERLES S., FERTAKIS A. -
"La leucoconcentration dans les leucémies myéloïdes"
Semai. Hop. 1962, *67*, 2755

38 - MARCHAL G., PERLES S., FERTAKIS A., VAN GOOL -
"Les migrations sanguines des cellules de Sternberg dans la maladie de Hodgkin (leucoconcentration)"
Semai. Hopit. 1962, *12*, 568

39 - MAUPIN -
"Technique de séparation de globules blancs"
Nouvelle revue d'hématologie 1959, *14*, 250-265
335-379
443-486

40 - MEIAMED M.R., CLIFFTON E.E., SEAL SH. -
"Cancer cells in the peripheral venous blood a quantitative study of cells of problematic oririgin"
Amer J. Clin. Path. 1962, *37*, 381-388

41 - MINOR. AH. - BURNETT L. -
"A method for obtaining living leucocytes from huma peripheral blood by acceleration of erythrocytes sedimentation"
Blood 1948, *3*, 799-802

42 - MOORE G.E. -
"The significance of cancer cells in the blood"
Surg. gynec et obst. 1960, *110*, 360-361

43 - MOORE G.E. - SANDBERG A.A. WATNE A.L. -
"The comparative size and structure of tumor cells and clumps in the blood bone marrow and tumor imprints"
Cancer A. 1960, *13*, 111-117

44 - MOORE G.E. - SANDBERG A.A. - WATNE A.L. -
"Spread of cancer cells and its relation ship to chemotherapie"
J.A.M.A. 1960, *172*, 1729-1733

45 - OLOF ERICKSON -
"Method for cytological detection of cancer cells in blood"
Cancer 1962, *15*, 171-175

46 - PAPANICOLAOU -
Atlas of exboliative cytology 1960, supp. N° 2

47 - POTTER J.F. -
"The circulating cancer cells"
Lancet 1960, *2*, 476-477

48 - POTTER J.F., LONGEBAUCH G. -
"The relationship of tumor type and resectability to the incidence of cancer cells in the blood"
Surg. Obst. 1960, *110*, 734-738

49 - PRUITT J.C. - HILBERG A.W. - MOREHEAD A.P. -
"Quantitative study of malignant cells in local peripheral blood"
Surg. gynec et obst. 1962 Fév. 114

50 - RAKER J.W. - PRISCILLA TAFT - EDMONS E.E. -
"Significance of megacaryocytes in the research for thumor cells in blood"
New Engl. J. Med. 1960, *263*, 993-994

51 - RATTUNDE - HENRY F. - KNUDSON ALFRED G. -
"A method for recovering large numbers of platelets and leucocytes from human blood"
J. Lab. Clin. Med. 1959, *54*, 484

52 - REDON -
"Reflexions sur les tendances métastatiques des tumeurs malignes"
Vie médicale 1961, *42*, 917-926

53 - ROBERTS S., JONASSON O., LONG L., MAC GRATH R., MAC GREW, COLE W.A. -
"Clinical significance of cancer cells in the circulating blood two to five year survival"
Ann Surg. 1961, *54*, 362-271

54 - ROBERTS S., ALWIN WATNE, MAC GRATH, MAC GREW and WARREN COLE -
"Technique and results of isolation of cancer cells from circulating blood".
Archives of surgery 1958, *76*, 334

55 - SCHENIN T.H. -
"The occurance of cancer cells in blood"
Surgery 1962, *51*, 652-657

56 - SEAL S.H. -
"Silicone flotation ; simple quantitative method for isolation of free flotaing cancer cells from blood".
Cancer 1959, *12*, 590-595

57 - SEAL S.H. -
"A method for concentrating cancer cells suspended in large quantities of fluid"
Cancer 1956, *9*, 866-868

58 - SPEAR F. -
"Separation of leucocytes from whole blood by flotation on gum acacia"
Blood 1948, *3*, 1055-1056

59 - SPRIGGS A.I. -
"A propos de la présence de cellules tumorales dans le sang"
Path. Biol. 1960, *8*, 2101-2105

60 - SPRIGGS A.I. -
"Malignant cells in blood stream"
Proc. Roy. Soc. Med. 1960, *53*, 169-171

61 - STEWART J.W. -
"Circulating cancer cells in the blood stream"
Cancer Prog. 1960

62 - SUSUMI IZUCHI, MAMORU, YAMADA, and MIKO YAGI -
"Atypical cells in the circulation blood of the patients with malignant tumors"
Ky. Nshu. J. Med. Sci. 1961, *12*, 325-331

63 - WATNE A.L. - SANDBERG A.A. - MOORE E.E. -
"La viabilité des cellules cancéreuses dans le sang circulant et leur rôle dans la formation des métastases"
Arch. Surg. 1961, *83*, 190-195

64 - WITHBY LIONEL -
"The significance of megacaryocytes in the peripheral blood"
Blood 1948, *3*, 934-938

65 - YOSHINOBU ISHIKAWA - TATSURO, FUKISHIMA -
"Studies on the estimation of cancer cells by acridine orange fluorescence microscopie method"
Tohoku J. Exp. Me. 1962, *77*, 164-170.

TABLE DES MATIERES

Pages

- INTRODUCTION 1

- PREMIERE PARTIE :
  Différentes techniques d'enrichissement leucocytaire : 3

  1 - Historique 3
  2 - Méthodes générales de concentration leucocytaire 5
  3 - Technique personnelle 10

- DEUXIEME PARTIE :
  Exposé des résultats 15

- TROISIEME PARTIE :
  Discussion des résultats 37

- CONCLUSION 47

- BIBLIOGRAPHIE 49